

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.  
G01N 33/574 (2006.01)



## [12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200910094168.2

[43] 公开日 2009年7月29日

[11] 公开号 CN 101493464A

[22] 申请日 2009.3.9

[21] 申请号 200910094168.2

[71] 申请人 昆明理工大学

地址 650093 云南省昆明市五华区学府路 253  
号(昆明理工大学)

[72] 发明人 白洁 党英男 蒋爱梅 李彦辉

[74] 专利代理机构 昆明今威专利代理有限公司  
代理人 赛晓刚

权利要求书 1 页 说明书 6 页 附图 1 页

### [54] 发明名称

诊断乳腺癌的分子标记物

### [57] 摘要

本发明公开一种诊断乳腺癌的分子标记物，检测乳房正常周边组织与包块组织中的硫氧还蛋白(thioredoxin, TRX)和硫氧还蛋白结合蛋白 2(TRX-bindingprotein-2, TBP-2)的表达。采用蛋白免疫印迹实验检测硫氧还蛋白、硫氧还蛋白结合蛋白 2 的表达量，在乳腺包块组织中硫氧还蛋白表达增高和硫氧还蛋白结合蛋白 2 表达降低，由于与正常乳腺组织存在显著的差别，硫氧还蛋白和硫氧还蛋白结合蛋白 2 可以作为乳腺癌新的分子标记物，可作为对乳腺癌临床诊断。

- 
- 1、诊断乳腺癌的分子标记物，该方法包括从样品中获得乳腺包块组织和正常周边组织样品，测定和比较样品中硫氧还蛋白和硫氧还蛋白结合蛋白 2 的表达量。
  - 2、如权利要求 1 的方法，其中蛋白的表达水平通过蛋白免疫印迹法测定。
  - 3、如权利要求 1 的方法，其中当硫氧还蛋白表达水平高于、硫氧还蛋白结合蛋白 2 表达水平低于正常乳房组织的表达水平时，判断为乳腺癌。
  - 4、如权利要求 1 的方法，比较包块组织与正常周边组织中硫氧还蛋白和硫氧还蛋白结合蛋白 2 的表达是用特异性抗硫氧还蛋白/硫氧还蛋白结合蛋白 2 的抗体检测得到的包块组织的硫氧还蛋白、硫氧还蛋白结合蛋白 2 的表达量与正常周边组织中该两种蛋白的表达量进行比较，如测得的包块组织硫氧还蛋白表达量高于正常周边组织，硫氧还蛋白结合蛋白 2 表达量低于正常周边组织时，诊断为乳腺癌。
  - 5、硫氧还蛋白和硫氧还蛋白结合蛋白 2 用作检测乳腺癌的蛋白质分子标记。
  - 6、硫氧还蛋白和硫氧还蛋白结合蛋白 2 用于临床诊断乳腺癌。

## 诊断乳腺癌的分子标记物

### 技术领域

本发明属于生物技术领域，具体地，涉及一种诊断乳腺癌的蛋白质免疫印迹方法，及硫氧还蛋白和硫氧还蛋白结合蛋白 2 用作检测乳腺癌的蛋白质分子标记，在诊断乳腺癌的临床中的应用。

### 背景技术

乳腺癌是危害女性健康的主要疾病之一，全世界每年约有一百多万妇女患有乳腺癌。男性也可患乳腺癌，但男性患乳腺癌的机率比女性要少近 100 倍。乳腺癌的发病期多数在 40-60 岁，其发生原因尚无定论，一般认为与性激素的变化有关，并具有一定的家族性。早期乳腺癌可无任何自觉症状，病变晚期可出现乳腺肿块，肿块质地硬韧，边界不甚清晰，无包膜感，推之移动性小，多数无明显疼痛。到目前为止，已有一些基因异常表达被确定与乳腺癌发生发展有关，但被确定的乳腺癌相关基因在乳腺癌中的异常表达率并不高，乳腺癌早期诊断率仍有待提高。此外，传统的乳腺癌手术加化疗以及近年来配合使用的多种基因治疗方法预后效果较差，没有显著提高乳腺癌患者的生存率，因而寻找新的乳腺癌相关基因尤其是乳腺癌异常表达基因对于探讨乳腺癌的发病机制具有重要意义，迫切需要寻找新的在乳腺癌中表达变化显著的基因或蛋白。

硫氧还蛋白 (thioredoxin, TRX) 又称白细胞介素-1 样细胞因子、成人 T 细胞白血病演化因子、早孕因子等。人硫氧还蛋白是由 104 个氨基酸组成的分子量为 12 kDa 的多肽。硫氧还蛋白在细胞增殖、生存及抑制凋亡过程中起着重要的调节作用。作为一种生长因子，硫氧还蛋白可以被淋巴细胞、肝细胞、成纤维细胞以及许多癌细胞系分泌，并且诱导其自身生长。对一系列人原发肿瘤研究结果显示，将肿瘤组织与正常组织相比，肿瘤组织中硫氧还蛋白过度表达，其表达水平和细胞增殖呈显著正相关。

硫氧还蛋白结合蛋白2 (TRX-binding protein-2, TBP-2) 又称为维生素D<sub>3</sub>上调蛋白1 (vitamin D<sub>3</sub> up-regulated protein 1, VDUP1), 分子量约为46 kDa。硫氧还蛋白结合蛋白2广泛分布在动物的多种组织中包括: 肾上腺、心脏、肺组织、胸腺、脾脏、睾丸、骨骼肌、肾脏、肝脏、乳腺、卵巢等, 其中它在肺组织中的表达量相对较高, 而在脑组织和肝脏组织中的表达量相对较低。硫氧还蛋白结合蛋白2可以与硫氧还蛋白相互作用。在一些肿瘤组织中, 硫氧还蛋白结合蛋白2表达缺失, 若将硫氧还蛋白结合蛋白2转染到癌细胞中, 过表达的硫氧还蛋白结合蛋白2抑制细胞生长, 促使细胞凋亡。硫氧还蛋白结合蛋白2还抑制细胞周期, 使细胞周期滞留在G<sub>0</sub>期, 这表明硫氧还蛋白结合蛋白2与肿瘤生长密切相关。

因此, 硫氧还蛋白和硫氧还蛋白结合蛋白2是研究乳腺癌新的靶位点。但是到目前为止, 现有技术中未见硫氧还蛋白和硫氧还蛋白结合蛋白2与乳腺癌的相关性的报道。

## 发明内容

本发明旨在提供一种诊断乳腺癌分子标记物。本申请找到了一种在乳腺癌包块组织和正常周边组织中存在差异表达的蛋白质。免疫印迹实验证实, 硫氧还蛋白和硫氧还蛋白结合蛋白 2 的确在乳腺癌包块组织和正常周边组织中存在明显差异表达。

基于硫氧还蛋白和硫氧还蛋白结合蛋白 2 与乳腺癌的这种相关性, 以这两种蛋白作为一个蛋白分子标记对其表达量进行检测可以用于检测乳腺癌。

本发明的目的在于提供一种体外检测乳腺细胞中硫氧还蛋白和硫氧还蛋白结合蛋白 2 的表达是否异常的方法;

因此, 本发明的另一目的在于提供一种硫氧还蛋白和硫氧还蛋白结合蛋白 2 用作检测乳腺癌的蛋白质分子标记的应用。

鉴于到目前为止, 还没有硫氧还蛋白和硫氧还蛋白结合蛋白 2 与乳腺癌的相关性的报道, 因此, 本发明的这一发现将为乳腺癌的诊断和/或治疗提供一条新的辅

助途径。

为了实现本发明的上述目的，本发明提供了如下的技术方案：

诊断乳腺癌的方法，包括从样品中获得乳腺包块组织和正常周边组织样品，测定和比较样品中硫氧还蛋白和硫氧还蛋白结合蛋白 2 的表达量。

其中蛋白的表达水平通过蛋白免疫印迹法测定。

其中当硫氧还蛋白表达水平高于、硫氧还蛋白结合蛋白 2 表达水平低于正常乳房组织的表达水平时，判断为乳腺癌。

比较包块组织与正常周边组织中硫氧还蛋白和硫氧还蛋白结合蛋白 2 的表达是用比较用特异性抗硫氧还蛋白/硫氧还蛋白结合蛋白 2 的抗体检测得到的包块组织中硫氧还蛋白、硫氧还蛋白结合蛋白 2 的表达量与正常周边组织该两种蛋白量进行比较，如测得的包块组织硫氧还蛋白表达量高于正常周边组织，硫氧还蛋白结合蛋白 2 表达量低于正常周边组织时，诊断为乳腺癌。

该方法包括以下步骤：

用特异性抗硫氧还蛋白/硫氧还蛋白结合蛋白 2 的抗体检测待测乳腺细胞中硫氧还蛋白和硫氧还蛋白结合蛋白 2 的表达量；

将步骤 A 测得的硫氧还蛋白和硫氧还蛋白结合蛋白 2 表达量与正常乳腺组织中硫氧还蛋白和硫氧还蛋白结合蛋白 2 表达量进行比较，如测得的硫氧还蛋白表达量高于正常值，硫氧还蛋白结合蛋白 2 表达量低于正常值，则表示被检测组织中硫氧还蛋白和硫氧还蛋白结合蛋白 2 的表达异常。

本发明的方法用于诊断乳腺癌。

#### 附图说明：

图 1 为硫氧还蛋白在乳腺癌正常周边组织和包块组织的免疫印迹分析结果示意图，显示硫氧还蛋白在乳腺癌患者的包块组织中表达明显上调；

图 2 为硫氧还蛋白结合蛋白 2 在乳腺癌正常周边组织和包块组织的免疫印迹分

析结果示意图，显示硫氧还蛋白结合蛋白 2 在乳腺癌患者的包块组织中表达明显下调。

### 具体实施方式

下面结合具体实施例，进一步阐述本发明。应理解，这些实施例仅用于说明本发明而不用来限制本发明的范围。

下列实施中未注明具体条件的实验方法，通常按照常规条件、实验手册或者制造商所建议的条件。

本实施例所有包块组织和正常周边组织样品均取自同一乳腺癌患者的成对样品，30 例样品年龄在 28~71 岁。

#### 实施例 1:

乳腺癌正常周边组织及包块组织蛋白质样品的制备:

乳腺组织: 样品均来自云南省昆明医学院附属第一医院, 所有肿瘤都已得到病理确诊。

乳腺癌正常周边组织和包块组织蛋白质样品制备方法, 具体如下:

1、手术切除的新鲜组织块保存于-80℃冰箱。

2、制备蛋白质时, 切取 5 毫米左右的组织块, 在冰上用研磨器研磨成细胞沉淀, 加入 120 微升细胞裂解液 (氯化钠、NP-40、Tris、PMSF、aprotinin、Na<sub>3</sub>N/100 毫升), 置于冰上作用 50 分钟, 之后 12000r/min, 4℃离心 15 分钟, 取上清保存于-80℃冰箱。

#### 实施例 2:

硫氧还蛋白和硫氧还蛋白结合蛋白 2 蛋白免疫印迹法验证:

为确认硫氧还蛋白和硫氧还蛋白结合蛋白 2 的差异表达, 取 30 例乳腺癌患者的包块组织及相应正常周边组织蛋白质样品, 用分别抗硫氧还蛋白、硫氧还蛋白结合蛋白 2 的抗体进行免疫印迹分析, 具体过程简述如下:

每例样品取 7ug 蛋白质总上样量, 用 15%SDS-PAGE 分离, 转移至 PVDF 膜 (购自 Millipore 公司) 上, 脱脂奶 4℃ 孵育 PVDF 膜过夜。用 TPBS 洗涤三次, 每次 5 分钟。一抗使用小鼠抗人硫氧还蛋白抗体 (日本京都大学淀井溶司教授提供), 室温下孵育 1 小时, 用 TPBS 洗涤三次, 每次 5 分钟。二抗抗小鼠 (affinity purified antibody peroxidase labeled goat anti-mouse IgG(H+L) HSA liquid conjugate, 购自美国 Kirkegaard & laboratories), 室温孵育 1 小时, 再用 TPBS 洗涤 5 次, 前三次每次 10 分钟, 后两次每次 5 分钟。最后用化学发光底物 (购自晶美生物公司) 喷洒 PVDF 膜试剂, 以 X-光片 (购自乐凯公司) 曝光检测, 检测结果如图 1 所示, 硫氧还蛋白在乳腺癌包块组织中表达量高于在相应正常周边组织中。

每例样品取 30ug 蛋白质总上样量, 用 10%SDS-PAGE 分离, 转移至 PVDF 膜 (购自 Millipore 公司) 上, 脱脂奶 4℃ 孵育 PVDF 膜过夜。用 TPBS 洗涤三次, 每次 5 分钟。一抗使用兔抗人硫氧还蛋白结合蛋白 2 抗体 (santa cruz Biotechnology), 室温下孵育 2 小时, 用 TPBS 洗涤三次, 每次 5 分钟。二抗为抗兔 (affinity purified antibody peroxidase labeled goat anti-rabbit IgG(H+L) HSA liquid conjugate, 购自美国 Kirkegaard & laboratories), 室温孵育 1 小时, 再用 TPBS 洗涤 6 次, 每次 10 分钟。最后化学发光底物 (购自晶美生物公司) 喷洒 PVDF 膜试剂, 以 X-光片 (购自乐凯公司) 曝光检测, 检测结果如图 2 所示, 硫氧还蛋白结合蛋白 2 在乳腺癌包块组织中表达量低于在相应正常周边组织中。

免疫印迹结果显示, 30 对包块组织和正常周边组织中基本都呈现这样的现象: 包块组织中硫氧还蛋白的条带浓度明显高于相应的正常周边组织, 而硫氧还蛋白结合蛋白 2 的条带浓度明显低于相应的正常周边组织。可见在乳腺癌包块组织中硫氧还蛋白存在高表达, 硫氧还蛋白结合蛋白 2 存在低表达。

综上所述, 硫氧还蛋白和硫氧还蛋白结合蛋白 2 在乳腺癌的包块组织和正常周边组织中存在差异表达, 显然与乳腺癌的发生发展有密切相关性。因此, 以硫氧还蛋白和硫氧还蛋白结合蛋白 2 作为蛋白分子标记对其表达量进行检测可以用于检测

乳腺癌。

虽然有关硫氧还蛋白和硫氧还蛋白结合蛋白2动态的生物学功能及肿瘤相关机制还有待进一步研究，但是将其作为检测乳腺癌的标记物是肯定的。硫氧还蛋白和硫氧还蛋白结合蛋白2可作为乳腺癌的潜在标志，而其在胞内的生物学功能提示硫氧还蛋白和硫氧还蛋白结合蛋白2可能作为乳腺癌的预后分子标志和临床治疗的靶分子。



